หัวข้อวิทยานิพนธ์	ผลของโมโนโคลนอลแอนติบอดีต่อ CD147 ในการควบคุมการดื้อยาแบบหลายขนานของเซลล์มะเร็งเม็ดเลือดขาวดื้อยา K562/ADR โดยผ่านการแสดงออกของพีไกลโคโปรตีนและเซอร์ไววิน
ผู้เขียน	นางสาวอรณิช สมโน
ปริญญา	วิทยาศาสตรมหาบัณฑิต (เทคนิคการแพทย์)
คณะกรรมการที่ปรึกษา	ผศ.ดร. สาวิตรี เจียมพานิชยกุล อาจารย์ที่ปรึกษาหลัก รศ.ดร. ทรงยศ อนุชปรีดากุล อาจารย์ที่ปรึกษาร่วม

ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Copyright© by Chiang Mai University
All rights reserved

บทคัดย่อ

มะเร็งเม็ดเลือดขาวเป็นโรคมะเร็งทางโลหิตวิทยาซึ่งมีผลต่อการเพิ่มขึ้นของเซลล์เม็ดเลือดขาวที่ผิดปกติ ปัจจุบันโรคมะเร็งเม็ดเลือดขาวเป็นโรคที่พบบ่อยเป็นลำดับที่ 11 ของโรคมะเร็งที่เกิดขึ้นทั่วโลกโดยมีอุบัติการณ์การเกิดโรคประมาณร้อยละ 2 ของโรคมะเร็งทั้งหมด เคมีบำบัดเป็นการรักษาโรคมะเร็งเม็ดเลือดขาวที่มีประสิทธิภาพที่สุด แต่อย่างไรก็ตามพบว่าการเกิดการดื้อยาหลายขนาน (Multidrug resistance หรือ MDR) เป็นปัญหาสำคัญที่ทำให้การรักษามะเร็งเม็ดเลือดขาวล้มเหลว ปัจจุบันพบสองกลไกหลักสำคัญที่ทำให้เกิดการดื้อยาแบบหลายขนานคือ การแสดงออกเพิ่มขึ้นของโปรตีนขับไล่ยาในกลุ่ม ATP-binding cassette (ABC) drug transporter ชนิด พี ไกลโคโปรตีน (P-gp หรือ ABCB1 หรือ MDR1) และการแสดงออกเพิ่มขึ้นของโปรตีนที่ยับยั้งการตายแบบอะพอพโตซิส เช่น เซอร์ไววิน อย่างไรก็ตามยังไม่ทราบแน่ชัดถึงกลไกการควบคุมโมเลกุลทั้งสอง นอกจากนี้ยังมีรายงานว่า โมเลกุล CD147 เป็นโปรตีนที่มีการแสดงออกเพิ่มขึ้นและเกี่ยวข้องกับการดื้อยาแบบหลายขนานในเซลล์มะเร็งหลายชนิด อย่างไรก็ตาม ยังไม่มีการรายงานถึงความสัมพันธ์ของ พี ไกลโคโปรตีน เซอร์ไววิน และ CD147 ในการควบคุมการดื้อยาแบบหลายขนานในมะเร็งเม็ดเลือดขาว ในปัจจุบัน โมโนโคลนอลแอนติบอดีถือเป็นเครื่องมือที่นำมาใช้ศึกษาการแสดงออกและการทำงานของโปรตีนที่สนใจ การศึกษาครั้งนี้มีวัตถุประสงค์เพื่อศึกษาความสัมพันธ์ระหว่างการแสดงออกของโปรตีน CD147 พี ไกลโคโปรตีน และเซอร์ไววินในการควบคุมการดื้อยาในเซลล์มะเร็งเม็ดเลือดขาว โดยใช้โมโนโคลนอลแอนติบอดีจำเพาะต่อโมเลกุลของโปรตีน CD147 การศึกษาการตอบสนองต่อ

ยาอะเดรียมัยซินของเซลล์มะเร็งเม็ดเลือดขาวไวต่อยาชนิด K562 และเซลล์มะเร็งเม็ดเลือดขาวดื้อยา K562/Adr โดยวิธี MTT พบว่ายาอะเดรียมัยซินแสดงความเป็นพิษต่อเซลล์ K562 มากกว่าเซลล์ K562/Adr และความเป็นพิษต่อเซลล์ขึ้นอยู่กับความเข้มข้นของยาซึ่งยืนยันฟีโนไทป์การดื้อยาของเซลล์มะเร็งเม็ดเลือดขาวชนิด K562/Adr การศึกษาการแสดงออกของ พี- ไกลโคโปรตีน เซอร์ไววิน และ CD147 โดยวิธีโฟลไซโตเมตรี Western blotting และ RT-PCR พบว่าเซลล์ K562/Adr มีการแสดงออกของ พี ไกลโคโปรตีน เซอร์ไววิน และ CD147 สูงกว่าเซลล์ K562 ทั้งในระดับเอ็มอาร์เอ็นเอและโปรตีนซึ่งแสดงให้เห็นถึงความสัมพันธ์ของ พี ไกลโคโปรตีน เซอร์ไววิน และ CD147 ในเซลล์มะเร็งเม็ดเลือดขาวที่มีการดื้อยาแบบหลายขนาน สำหรับการศึกษาการทำงานของพี ไกลโคโปรตีนและเซอร์ไววินโดยวิธี Rhodamine123 efflux และ cell cycle ตามลำดับ พบว่าเซลล์ K562/Adr มีการสะสมของ Rhodamine123 ลดลงซึ่งพบว่ามีความสัมพันธ์กับการหยุดวัฏจักรของเซลล์และลดการตายแบบอะพอพโทซิสเมื่อเปรียบเทียบกับเซลล์ K562 แสดงให้เห็นถึงความสัมพันธ์ของกลไกการทำงานของโปรตีนทั้งสองชนิดในการดื้อยา การศึกษาการควบคุมของ CD147 ต่อการแสดงออกของ พี ไกลโคโปรตีนและเซอร์ไววิน โดยใช้โมโนโคลนอลแอนติบอดีที่จำเพาะต่อโปรตีน CD147 ได้แก่โคลน M6-1E9 M6-1D4 MEM-M6/1 และ MEM-M6/6 โดยนำเซลล์มะเร็งเม็ดเลือดขาวชนิด K562/Adr เพาะเลี้ยงร่วมกับโมโนโคลนอลแอนติบอดีที่จำเพาะต่อโปรตีน CD147 ในความเข้มข้นที่ไม่เป็นพิษต่อเซลล์ที่เวลา 24 และ 48 ชั่วโมง ผลการศึกษาพบว่าโมโนโคลนอลแอนติบอดีโคลน MEM-M6/1 ลดการแสดงออกของ พี ไกลโคโปรตีน เซอร์ไววิน และ CD147 ระดับโปรตีน ในขณะที่ MEM-M6/6 ลดการแสดงออกของ พี ไกลโคโปรตีน เซอร์ไววิน และ CD147 ทั้งระดับเอ็มอาร์เอ็นเอและโปรตีนในเซลล์มะเร็งเม็ดเลือดขาวชนิด K562/Adr เปรียบเทียบกับเซลล์ K562/Adr ที่ไม่ได้เพาะเลี้ยงร่วมกับโมโนโคลแอนติบอดี อย่างไรก็ตามโคลน M6-1E9 และ M6-1D4 ไม่มีผลต่อการแสดงออกของพี ไกลโคโปรตีน เซอร์ไววิน และ CD147 ในทางตรงกันข้ามการเพาะเลี้ยงเซลล์ร่วมกับโมโนโคลนอลแอนติบอดีต่อโปรตีน CD147 ไม่มีผลต่อการทำงานของ พี ไกลโคโปรตีนและเซอร์ไววินในเซลล์มะเร็งเม็ดเลือดขาวชนิด K562/Adr ในการศึกษานี้สรุปได้ว่าโมโนโคลนอลแอนติบอดีต่อ CD147 โคลน MEM-M6/6 สามารถลดการแสดงออกของ CD147 พี ไกลโคโปรตีนและเซอร์ไววินทั้งในระดับยีนและโปรตีนแต่ไม่มีผลต่อการทำงานของ พี ไกลโคโปรตีนและเซอร์ไววิน งานวิจัยนี้เป็นการรายงานครั้งแรกที่แสดงว่า CD147 เป็นโมเลกุลตัวกลางที่ควบคุมการแสดงออกของ พี ไกลโคโปรตีนและเซอร์ไววินในเซลล์มะเร็งเม็ดเลือดขาวชนิดดื้อยาแบบหลายขนาน

ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Copyright© by Chiang Mai University
All rights reserved

Thesis Title	Effect of Anti-CD147 Monoclonal Antibodies on Regulation of Multidrug Resistance in K562/ADR Resistant Leukemic Cell Line *via* P-glycoprotein and Survivin Expression
Author	Miss Aoranit Somno
Degree	Master of Science (Medical Technology)
Advisory Committee	Asst. Prof. Dr. Sawitree Chiampanichayakul Avisor Assoc. Prof. Dr. Songyot Anuchapreeda Co-advisor

ABSTRACT

Leukemia is a hematologic malignant disease and results in the high number of abnormal white blood cells. To date, leukemia is the 11th most common malignancy worldwide, accounting for 2% of all cancers. Chemotherapy is the most effective method for leukemia treatment. However, multidrug resistance (MDR) is a major problem in leukemia treatment failure. Two major mechanisms have been proposed to promote MDR that are the overexpression of ATP-binding cassette (ABC) drug transporter proteins, P-glycoprotein (P-gp, ABCB1, MDR1), and increased expression of inhibitor of apoptosis proteins (IAPs) such as survivin. However, the regulation mechanisms of these proteins are unclear. CD147, a functional molecule, has been reported that it was overexpressed and involved in the multidrug resistance of various cell lines. However, the relations of P-gp, survivin, and CD147 in the regulation of multidrug resistance in leukemia have not been reported. To date, monoclonal antibodies (mAbs) have been used as a powerful tool to study expression and function of target proteins. This study was aimed to determine the linkage exists between the expression of CD147, P-gp, and survivin in the regulation of drug resistance in leukemic cell line by using mAbs against CD147. The sensitivity of K562 parental cells and K562/Adr resistance cells to adriamycin was determined by MTT assay. The results showed the cytotoxic effect of mAbs on drug sensitive K562 cells in a dose dependent

ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Copyright© by Chiang Mai University
All rights reserved

manner more than drug resistance K562/Adr cells. Thus, this result confirmed that K562/Adr is a leukemic cell with MDR phenotype. The studies of P-gp, survivin, and CD147 expressions were investigated by flow cytometry, Western blotting, and RT-PCR. The P-gp, survivin, and CD147 expressions showed the significant increase for both protein and mRNA levels in K562/Adr cells suggesting the involvement of P-gp, survivin and CD147 in drug resistance leukemic cells. The P-gp functional study and survivin function were assessed by Rhodamine123 (Rho123) efflux and cell cycle assay, respectively. The decreased level of Rho123 intracellular accumulation was related to a low number of cell cycle arrest and apoptotic cells in K562/Adr compared to K562 cell, suggesting a functional association between these two protein molecules in drug resistance mechanism of K562/Adr cells. To determine the regulatory effect of CD147 on P-gp and survivin expression, mAbs against CD147 including M6-1E9, M6-1D4, MEM-M6/1, and MEM-M6/6 were used. The K562/Adr cells were treated with non-cytotoxic concentrations of mAbs against CD147 for 24 and 48 hours. It was found that MEM-M6/1 clone decreased the P-gp, survivin, and CD147 protein levels, while MEM-M6/6 clone decreased the P-gp, survivin, and CD147 mRNA and protein levels in K562/Adr cells as compared to K562/Adr cells without mAbs. However, M6-1E9 and M6-1D4 clones had no effects on the expressions of P-gp, survivin, and CD147. In contrast, treatments of anti-CD147 mAbs had no effects on P-gp and survivin functions in K562/Adr cells. In summary, mAbs against CD147 clone MEM-M6/6 can decrease CD147, P-gp and survivin expression in both mRNA and protein levels but not P-gp and survivin functions. This knowledge is the first report, showing that CD147 mediates leukemia with multidrug resistance phenotype through the regulation of P-gp and survivin expressions.

ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Copyright© by Chiang Mai University
All rights reserved